



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66755** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
C12P 25/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКЦІЇ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ (ФМН) ШТАМОМ-НАДПРОДУЦЕНТОМ IMB Y-5028 CANDIDA FAMATA**

1

2

(21) u2011110685

(22) 05.09.2011

(24) 10.01.2012

(46) 10.01.2012, Бюл. № 1, 2012 р.

(72) СИБІРНИЙ АНДРІЙ АНДРІЙОВИЧ, ЯЦИШИН
ВАЛЕНТИНА ЮРІЇВНА, ФЕДОРОВИЧ ДАРІЯ ВА-
СИЛІВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб підвищення продукції флавінмононуклеотиду (ФМН), що включає підбір концентрацій компонентів середовища за допомогою методу математичного моделювання експериментів, який **відрізняється** тим, що для максимального синтезу ФМН штамом-надпродуцентом IMB Y-5028 *Candida famata* додатково визначають оптимальні параметри культивування (густина культури, час вирощування, температура, pH).

Корисна модель належить до галузі біотехнології і є способом оптимізації умов культивування для отримання флавінмононуклеотиду (ФМН) за допомогою рекомбінантного штаму дріжджів *Candida famata*.

5'-ФМН (рибофлавін-5'-фосфат) відіграє важливу роль як коензим у різноманітних ферментативних реакціях у живих організмах і є ефективним засобом профілактики і лікування захворювань, пов'язаних із порушенням біосинтезу цієї сполуки. 5'-ФМН у промислових масштабах отримують шляхом фосфорилування рибофлавіну (РФ) хімічними агентами [1], що призводить до одержання препарату, який містить побічні продукти, що можуть діяти як антивітаміни і/або як антагоністи РФ. Очищення ФМН від домішок є складним завданням. Крім того, препарати ФМН, отримані таким способом, є дуже дорогими, що знижує можливості їх широкого використання у практиці.

Іншими шляхами отримання ФМН є мікробні ферментаційні процеси [2]. Препарати ФМН, отримані ферментативним способом, можуть знайти застосування як лікарські препарати, які не містять домішок із невстановленою біологічною активністю, як барвник для харчової промисловості, як компонент системи біolumінесцентного аналізу, як реактив високого ступеня чистоти, а також як проміжний продукт для отримання флавінаденідинуклеотиду та його похідних.

Жодних природних штамів мікроорганізмів, здатних до надсинтезу ФМН, до цього часу не знайдено. Сконструйовано штами дріжджів *C. famata*, які, внаслідок заміни нативного промотору гена FMN1 на сильний промотор TEF1 (фактора

елонгації трансляції $\alpha 1$), здатні до нагромадження у культуральній рідині ФМН [3, 4].

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб підвищення продукції ФМН рекомбінантним штамом *C. famata* 13-76 шляхом оптимізації складу середовища, описаний [5], в якому за допомогою методів математичного моделювання експериментів встановлено, які компоненти середовища є важливими для синтезу ФМН, та підібрано концентрації цих компонентів, що забезпечують підвищення продуктивності утворення ФМН даним штамом.

Нами сконструйовано рекомбінантний штам IMB Y-5028 *C. famata* [4], здатний до синтезу більшої кількості ФМН, проте навіть в оптимізованому для штаму *C. famata* 13-76 середовищі продукція ФМН сконструйованим штамом є недостатньою для промислового виробництва цього нуклеотиду.

В основу запропонованого способу поставлено задачу підібрати концентрації компонентів середовища (за допомогою методу математичного моделювання експериментів) і визначити оптимальні параметри культивування (густина культури, час вирощування, температура, pH) для максимального синтезу ФМН штамом-надпродуцентом IMB Y-5028 *C. famata*.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі підвищення продукції ФМН, який включає підбір концентрацій компонентів середовища за допомогою методу математичного планування експериментів, згідно з корисною моделлю, для максимального синтезу ФМН штамом-надпродуцентом IMB Y-5028 *C. famata* додатково визначають оптимальні параметри культивування (густина культури, час вирощування, температура,

(13) **U**(11) **66755**(19) **UA**

pH). Запропонований спосіб забезпечує високу продуктивність синтезу ФМН і скорочує час ферментації.

Спосіб підвищення продукції ФМН ілюструється графічним матеріалом, на якому зображено вміст ФМН у культуральній рідині рекомбінантного штаму *S. famata* IMB Y-5028 при різному часі культивування.

У запропонованому способі використовуються наступні методи: центральний композиційний аналіз [6], програмний пакет Statistica® 6.0 Stat Soft, Inc. Вміст флавінів у культуральній рідині визначають на флюорометрі. Вміст ФМН у культуральній рідині визначають флюорометрично після хроматографічного розділення в 5 % Na_2HPO_4 .

Спосіб здійснюють кількома етапами.

Етап 1. Визначення густини культури, найбільш сприятливої для синтезу ФМН штамом *S. famata* IMB Y-5028.

При засіві 0,10 мг/л тривалість культивування, яка забезпечує утворення ФМН, становить 48-60

год. Інкубація густої суспензії клітин забезпечує скорочення часу культивування культури для максимального нагромадження ФМН. Густину культури, найбільш сприятливу для синтезу ФМН штамом *S. famata* IMB Y-5028, визначають при інкубації клітин у рідкому модифікованому середовищі Беркгольдера наступного складу (г/л): сахароза - 20; сечовина - 1; KH_2PO_4 - 4,277; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; CaCl_2 - 2,786; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,253; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0025; дріжджовий екстракт - 3,205; а також біотин - 1 мг/л; мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мкМ CuSO_4 ; 4,5 мкМ MnSO_4 ; 2,0 мкМ NaMoO_4 , 0,75 мкМ H_3BO_3 ; 17,5 мкМ ZnSO_4 [4]. Частота перемішування становить 220 об./хв., температура - 28 °С, час інкубації - 17 год.

Біосинтез ФМН за умов такої інкубації помітно залежить від початкової концентрації клітин у середовищі (Табл. 1).

Таблиця 1

Вміст флавінів у культуральній рідині рекомбінантного штаму IMB Y-5028 *S. famata* при різній початковій густині клітин

Густина клітин, мг/мл	Сумарний вміст флавінів, мг/л	ФМН, мг/л	%ФМН
2,0	155,6±0,55	83,9±0,22	53,9±5,03
3,0	332,5±0,53	195,5±0,41	58,8±2,38
5,0	328,7±0,98	188,0±0,81	57,2±1,39
7,5	376,4±1,00	176,9±0,55	47,0±4,73

$P < 0,05$

Сумарний вміст флавінів зростає відповідно до зростання густини суспензії, однак, вміст ФМН є максимальним при інкубації 3 мг/мл клітин протягом 17 год. у модифікованому СБ. При цьому відсотковий вміст ФМН також є найвищим при інкубації 3 мг/л клітин.

Етап 2. Визначення часу культивування для максимального синтезу ФМН штамом *S. famata* IMB Y-5028.

Час культивування визначають при інкубації 3 мг/мл клітин у рідкому модифікованому середовищі Беркгольдера [4] із частотою перемішування 220 об/хв та температурою 28 °С.

Загальний час інкубації клітин штаму IMB Y-5028 *S. famata* становить 48 год. Як видно на наведеному графіку, синтез ФМН досягає макси-

мального рівня - 218,2±7,73 мг/л на 21 год. інкубації 3 мг/мл клітин.

Етап 3. Визначення впливу температури, pH та перемішування на біосинтез ФМН штамом *S. famata* IMB Y-5028.

Вплив температури та pH на біосинтез ФМН штамом *S. famata* IMB Y-5028 визначають при інкубації 3 мг/мл клітин у рідкому модифікованому середовищі Беркгольдера [4] із частотою перемішування 220 об/хв, час інкубації - 21 год. (Табл. 2).

Температура культивування має суттєвий вплив на рівень синтезу ФМН. Найкращою для продукції ФМН є температура 28 °С. Вплив pH на синтез ФМН не є настільки суттєвим, як вплив температури, оптимальним значенням pH є 5,5.

Таблиця 2

Вміст ФМН (мг/л) у культуральній рідині штаму *S. famata* IMB Y-5028 за умов інкубації при різних значеннях температури (t, °С) і pH

pH \ t, °С	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
24	101,0±5,22	104,0±9,08	139,0±9,89	146,8±9,89	201,1±5,31	206,0±6,51
28	190,1±7,21	194,0±8,99	205,0±2,11	205,1±7,68	209,0±5,54	196,9±5,76
35	43,0±4,12	44,0±3,55	40,0±3,09	40,0±1,12	33,8±2,11	22,2±3,22
38	19,0±2,11	20,0±3,33	15,5±3,24	13,3±4,05	11,6±2,11	12,2±1,09
42	9,3±2,22	9,9±1,01	11,0±2,10	11,6±8,67	4,4±0,09	2,2±1,09

Найвищий рівень синтезу ФМН спостерігається при помірному перемішуванні. Серед дослідженої частоти перемішування (100, 220 та 300 об/хв), найбільше ФМН (205 мг/л) синтезується при 220 об/хв.

Етап 4. Оптимізація концентрації компонентів середовища культивування для максимального нагромадження ФМН штамом *C. famata* IMB Y-5028.

Для з'ясування, які концентрації компонентів середовища є важливими для підвищення рівня синтезу ФМН, застосовують методи математичного моделювання експериментів, зокрема, центральний композиційний аналіз. Цей процес включає наступні етапи: постановка відповідного експерименту, обчислення коефіцієнтів математичної моделі, а також передбачення відповіді та перевірка адекватності моделі. Використовують компоненти середовища, які, як було встановле-

но [4], мають позитивний вплив на продукцію ФМН. Кожен із досліджуваних компонентів використовують в експериментах у 5 різних концентраціях (Табл. 3), що умовно позначаються «-2», «-1», «0», «1», «2».

Схема матриці, експериментальні значення та теоретично розраховані значення відображено у табл. 4.

Для статистичних маніпуляцій компоненти заковдані згідно з наступним рівнянням:

$$X_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i},$$

де X_i - кодоване значення незалежної змінної x_i ,

x_i - дійсне значення незалежної змінної,

x_0 - дійсне значення незалежної змінної в центральній точці,

Δx_i - покрокова різниця.

Таблиця 3

Позначення та концентрації компонентів середовища для центрального композиційного аналізу з метою оптимізації синтезу ФМН штамом *C. famata* IMB Y-5028

Компоненти середовища	Позначення		Концентрація, г/л				
	Нековдані	Ковдані	-2	-1	0	1	2
KH_2PO_4	x_1	X_1	3,0000	4,0000	5,0000	6,0000	7,0000
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	x_2	X_2	1,5000	2,0000	2,5000	3,0000	3,5000
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	x_3	X_3	0,1500	0,2000	0,2500	0,3000	0,3500
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	x_4	X_4	0,0015	0,0020	0,0025	0,0030	0,0035
Дріжджовий екстракт	x_5	X_5	1,500	2,0000	2,5000	3,0000	3,5000

Вплив кожного компонента, їх взаємодія та статистичний аналіз отриманих передбачуваних значень визначають згідно з рівнянням:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2,$$

де Y - передбачувана відповідь,

β_0 - компенсаційний коефіцієнт,

β_i - лінійний вплив,

β_{ii} - квадратичний вплив,

β_{ij} - ефект взаємодії, X_i та

X_j - рівні незалежних змінних.

Статистичний аналіз моделі здійснюють за допомогою пакета статистики ANOVA. Для цих процедур використовують програмний пакет Statistica® 6.0 Stat Soft, Inc.

Матриця для центрального композиційного аналізу представляє 25^1 план факторного експерименту із дробними репліками, що включає 11 центральних значень та 10 аксіальних значень, де одна варіанта взята в екстремальному зна-

ченні (+2 або -2), а інші - у центральних значеннях.

Експериментальні дані, наведені у Табл. 4, є поліноміальною моделлю нелінійної регресії другого порядку. Емпіричні взаємодії між відзивом та аналізованими варіантами описуються поліноміальним рівнянням другого порядку:

$$Y = 334,448 - 7,356X_1 + 6,990X_2 - 4,560X_3 + 2,315X_4 + 15,148X_5 - 1,803X_1^2 - 3,453X_2^2 - 4,690X_3^2 - 0,153X_4^2 + 1,772X_5^2 - 14,678X_1X_2 - 7,666X_1X_3 - 3,541X_1X_4 + 0,034X_1X_5 + 6,566X_2X_3 + 0,653X_2X_4 + 4,641X_2X_5 - 0,722X_3X_4 + 0,928X_3X_5 + 5,603X_4X_5$$

де Y - очікуване значення продукції ФМН (мг/л),

а X_1 , X_2 , X_3 , X_4 та X_5 - кодовані значення компонентів (KH_2PO_4 , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, CuSO_4 та дріжджовий екстракт, відповідно).

Таблиця 4

Матриця для центрального композиційного аналізу та продукція ФМН штамом *S. famata* IMB Y-5028 як результат аналізу

№ п/п	Концентрації компонентів					ФМН, мг/л	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Експериментальні значення	Прогнозовані значення
	-1	-1	-1	-1	1	309,1	313,3
2	-1	-1	-1	1	-1	309,6	306,0
3	-1	-1	1	-1	-1	299,2	298,1
4	-1	-1	1	1	1	322,8	329,8
5	-1	1	-1	-1	-1	337,1	325,0
6	-1	1	-1	1	1	381,1	377,1
7	-1	1	1	-1	1	375,7	374,1
8	-1	1	1	1	-1	353,7	344,3
9	1	-1	-1	-1	-1	342,6	342,4
10	1	-1	-1	1	1	351,4	359,3
11	1	-1	1	-1	1	305,8	316,1
12	1	-1	1	1	-1	285,4	288,0
13	1	1	-1	-1	1	330,6	329,9
14	1	1	-1	1	-1	300,9	292,4
15	1	1	1	-1	-1	297,6	291,6
16	1	1	1	1	1	328,3	330,5
17	-2	0	0	0	0	333,3	341,9
18	2	0	0	0	0	317,9	312,5
19	0	-2	0	0	0	321,8	306,7
20	0	2	0	0	0	316,3	334,6
21	0	0	-2	0	0	317,9	324,8
22	0	0	2	0	0	310,2	306,6
23	0	0	0	-2	0	327,3	329,2
24	0	0	0	2	0	337,1	338,5
25	0	0	0	0	-2	293,7	311,2
26	0	0	0	0	2	386,1	371,8
27	0	0	0	0	0	336,1	334,4
28	0	0	0	0	0	336,6	334,4
29	0	0	0	0	0	341,5	334,4
30	0	0	0	0	0	336,6	334,4
31	0	0	0	0	0	333,3	334,4
32	0	0	0	0	0	333,3	334,4
33	0	0	0	0	0	336,6	334,4
34	0	0	0	0	0	341,5	334,4
35	0	0	0	0	0	323,4	334,4
36	0	0	0	0	0	325,0	334,4
37	0	0	0	0	0	336,1	334,4

Центральний композиційний аналіз та аналіз «на поверхні відзиву» дали змогу визначити оптимальні для синтезу ФМН концентрації компонентів середовища, а саме: KH_2PO_4 - 4,999 г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 2,600 г/л; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,240 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0013 г/л; дріжджовий екстракт - 2,198 г/л. Прогнозований максимум продукції ФМН згідно з цими значеннями становив 328,25 мг/л. Порівняно зі складом середовища, використаного раніше [4], дане оптимізоване середовище містить на 15 % більше KH_2PO_4 , на 7 % менше CaCl_2 , на 5 % менше $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, вдвічі менше CuSO_4 та на 31 % менше дріжджового екстракту.

Для перевірки даних центрального композиційного аналізу 3 мг/мл клітин дріжджів інкубували у 100 мл колбах, що містять 10 мл середовища оптимізованого складу (згідно з прогнозованими даних моделі) (г/л): сахароза - 20; сечовина - 1; KH_2PO_4 - 4,999; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; CaCl_2 - 2,600; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,240; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0013; дріжджовий екстракт - 2,198; а також біотин - 1 мг/л; мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мкМ CuSO_4 ; 4,5 мкМ MnSO_4 ; 2,0 мкМ NaMoO_4 ; 0,75 мкМ H_3BO_3 ; 17,5 мкМ ZnSO_4 . Частота перемішування становила 220 об/хв, температура - 28 °С, час інкубації - 21 год, рН 5,5.

Результати, отримані у трьох окремих експериментах, були близькими до прогнозованих результатів. Передбачувана продукція ФМН становила 328,25 мг/л, тоді як експериментально отримано $318,2 \pm 7,411$ мг/л ФМН. Це підтверджує достовірність теоретичної моделі.

Джерела інформації:

1. Березовский В. М. Химия витаминов.- М.: Пищевая пром., 1973. - 632 с.
2. Stahmann K. P. et al. Microbiol. and Biotechnol. - 2000. - Vol. 53, N5 - P. 509-516. - 196 p.

3. Патент України на винахід № 87684 МПК C12P25/00 а12 N15/00; опублік. 10.08.2009 р., Бюл. № 15.

4. Yatsyshyn V. Y. et al. Metabol. Eng. -2009. - Vol. 11, № 3. -P. 163-167.

5. Yatsyshyn V. Y. et al. Biochem. Eng. J. - 2010. - Vol. 49, № 1. - P. 52-60.

6. Montgomery D. C. Design and Analysis of Experiments / D. C. Montgomery. - [4-th edn.]. -NY: Wiley, 1997.

